

JP04330284A

MicroPatent Report**GENE CODING DIAMINOPELARGONIC ACID
AMINOTRANSFERASE AND DESTHIOBiotin SYNTHETASE
AND ITS UTILIZATION**

[71] **Applicant:** MITSUBISHI
PETROCHEM CO LTD

[72] **Inventors:** KOHAMA KEIKO;
HOSOGANE MAYUMI;
KOBAYASHI MIKI;
HATAKEYAMA KAZUHISA ...

[21] **Application No.:** JP03174757

[No drawing]

[22] **Filed:** 19910620

[43] **Published:** 19921118

[30] **Priority:** JP 62572 19910304

[Go to Fulltext](#)

[57] Abstract:

PURPOSE: To obtain a novel DNA fragment used for producing diaminopelargonic acid aminotransferase and desthiobiotin synthetase in a *Cornebacterium* type bacterial cell. CONSTITUTION: A DNA fragment containing a gene coding diaminopelargonic acid aminotransferase and desthiobiotin synthetase derived from a *Gorynebacterium* type bacterium. The fragment is synthesized by an ordinary DNA synthesizing device.

COPYRIGHT: (C)1992,JPO&Japio

[51] **Int'l Class:** C12N01554 C12N00121 C12N00900 C12N00910
C12N01552 C12N01554 C12R00113 C12N00121 C12R00113

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平4-330284

(43)公開日 平成4年(1992)11月18日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 N 15/54	Z NA			
1/21		7236-4B		
9/00		7823-4B		
9/10		7823-4B		
		8828-4B	C 12 N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数13(全 22 頁) 最終頁に統く

(21)出願番号	特願平3-174757	(71)出願人	000006057 三菱油化株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
(22)出願日	平成3年(1991)6月20日	(72)発明者	小浜 恵子 茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号三 菱油化株式会社筑波総合研究所内
(31)優先権主張番号	特願平3-62572	(72)発明者	細金 真由美 茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号三 菱油化株式会社筑波総合研究所内
(32)優先日	平3(1991)3月4日	(72)発明者	小林 幹 茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号三 菱油化株式会社筑波総合研究所内
(33)優先権主張国	日本 (JP)	(74)代理人	弁理士 小田島 平吉 (外1名) 最終頁に統く

(54)【発明の名称】 ジアミノペラルゴン酸アミノトランスクエラーゼ及びデスチオビオチンシンセターゼをコードする遺伝子並びにその利用

(57)【要約】

【構成】 ブレピバクテリウム・フラバムMJ-233
株から単離されるジアミノペラルゴン酸アミノトランスクエラーゼ及びデスチオビオチンシンセターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片。

【効果】 このDNA断片を導入したコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラスミドで形質転換されたブレピバクテリウム・フラバムMJ-233は、ジアミノペラルゴン酸アミノトランスクエラーゼ及び/又はデスチオビオチンシンセターゼの高い生産性を示す。

1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 コリネ型細菌由来のジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオビオチンシンセターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片。

【請求項2】 コリネ型細菌がビオチン要求性の菌株である請求項1記載のDNA断片。

【請求項3】 ビオチン要求性のコリネ型細菌がプレビパクテリウム・フラバムMJ-233である請求項2記*

*載のDNA断片。

【請求項4】 制限酵素Sal Iで切り出すことにより得られる大きさが約4.0kbである請求項3記載のDNA断片。

【請求項5】 下記表1に記載する制限酵素で切断した場合、下記表1に記載する認識部位数と切断断片の大きさを示す請求項2記載のDNA断片。

【表1】

表1

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ(kb)
BamHI	1	0.8, 3.2
Dra II	1	1.2, 2.8
Sac I	1	1.8, 2.2
Xba I	1	1.3, 2.7

【請求項6】 次のDNA塩基配列で示されるジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼをコードする遺*

```

ATGGAAAACCCAGCTTGCG CGAGCTTGTGAT CACCGAAACA TCTGGCACCC GTATGCCCG 60
CCGGCGCTGC GCAACAGACT CGTCACCAAC ACTGATGGGG TGTTCTTGAC GCTGGAAGAT 120
GGCAGCAGCG TGATTGACGC GATGAGCTCC TGGTGGTCGG CAATTGATGG ACACGGACAC 180
CCCCGACTGA AACGTGCCGC CCAAAACAA ATCGACACCA TGAGTCACGT CATGTTGGC 240
GGACTAACCC ACCAGGCCGC CATTAAAGCTC ACCCACAAAC TCTCAATCT CACTGGCAAT 300
GCCCTTGACCC AGCTCTTTA TTCCGAITCG GCCTCCGTCT CGGTGGAGGT CGCCATCAA 360
ATGGCACTGC AGGCTCCAA AGGACAAAGGC CACCCGGAAAC GCACAAAAGT CCTCACCTGG 420
CGGTCCGGCT ACCACGGAGA CACATTCAAC CGCATGAGCG TGTGCGACCC AGAAAATGGC 480
ATGCATAGCC TCTGGAAAGG CACACTCCCC GAGCAGATTG TGGCCCCCGC CCCACCAGTT 540
CGGGGGTCACT CGCCGCAGGC AATTCGGAG TACCTGCCACA GCATGGAATT CCTTATOGAC 600
GAGACCGCTCG CGCAATCAT CATCGAACCG ATCGTCCAAG GCGCTGGAGG CATGCGCTTT 660
CACCGATGCG CACTCATGAG AGGAGTCGGG GCACTGTGCA AGAAGCACGA TCGTTTCTTG 720
ATCGTCGATG AAATGGCAC CGGTTTCCGC CGCACCGGTG AACTATTGCA CACGTTAACG 780
AATGGCGTAC AACAGACAT CATGCTGTG GGCAAGGCC TCAACGGTGG ATTCAIGCT 840
TTTGGCCCA CTGTATGCCAC GGACAAGGTG GCTCAATTGA TCAGATCCCC AGAAGGCGGA 900
GGTGTGCTGA TGCAATGCC CACCTTATG GCTAATCCTC TGGCCTGTGA GGTTTGCAC 960
GCTTCGCTAG AAATCATTGA GACGGCCATG TGGCAGAAAC AGGTTAAAAAA AATCGAAGCC 1020
AAACTTATCG CAGGCCCTTC CCCACTTCGA TGTATTCCAG GAGTTCCCGA TGTCCGGTT 1080
CTCGGCCGCA TTGGCGTCAT CGAAATGGA CAAATGTGA ATGTCGAAGA AGCCACTCAG 1140
GCTGCTTAG ATCACGGTGT GTGGATCCGC CCCTTGGAC GCTTGTCTTA TGTCAATGCC 1200
CCATATATCA CCACGTCAGA GCAATGCCA CAGATCTGCC GCGCGCTTCA TGTGCAAGTT 1260
AAAGGAAAAT AA 1272

```

【請求項7】 次のアミノ酸配列を有するジアミノペラ40DNA断片。
ルゴン酸アミノトランスフェラーゼをコードする遺伝子

```

Met Glu Asn Pro Ser Leu Arg Glu Leu Asp His Arg Asn Ile Trp His
1 5 10 15
Pro Tyr Ala Ala Pro Gly Val Arg Asn Arg Leu Val Thr Asn Thr Asp
20 25 30
Gly Val Phe Leu Thr Leu Glu Asp Gly Ser Thr Val Ile Asp Ala Met
35 40 45
Ser Ser Trp Trp Ser Ala Ile His Gly His Gly His Pro Arg Leu Lys
50 55 60
Arg Ala Ala Gln Lys Glu Ile Asp Thr Met Ser His Val Met Phe Gly

```

3		4
65	70	75
Gly Leu Thr His Glu Pro Ala Ile Lys Leu Thr His Lys Leu Leu Asn		80
85	90	95
Leu Thr Gly Asn Ala Phe Asp His Val Phe Tyr Ser Asp Ser Gly Ser		
100	105	110
Val Ser Val Glu Val Ala Ile Lys Met Ala Leu Gln Ala Ser Lys Gly		
115	120	125
Gln Gly His Pro Glu Arg Thr Lys Leu Leu Thr Trp Arg Ser Gly Tyr		
130	135	140
His Gly Asp Thr Phe Thr Ala Met Ser Val Cys Asp Pro Glu Asn Gly		
145	150	155
Met His Ser Leu Trp Lys Gly Thr Leu Pro Glu Gln Ile Phe Ala Pro		160
165	170	175
Ala Pro Pro Val Arg Gly Ser Ser Pro Gln Ala Ile Ser Glu Tyr Leu		
180	185	190
His Ser Met Glu Leu Leu Ile Asp Glu Thr Val Ser Ala Ile Ile Ile		
195	200	205
Glu Pro Ile Val Gln Gly Ala Gly Gly Met Arg Phe His Asp Val Ala		
210	215	220
Leu Ile Glu Gly Val Ala Ala Leu Cys Lys Lys His Asp Arg Phe Leu		
225	230	235
Ile Val Asp Glu Ile Ala Thr Gly Phe Gly Arg Thr Gly Glu Leu Phe		
245	250	255
Ala Thr Leu Ser Asn Gly Val Gln Pro Asp Ile Met Cys Val Gly Lys		
260	265	270
Ala Leu Thr Gly Gly Phe Met Ser Phe Ala Ala Thr Val Cys Thr Asp		
275	280	285
Lys Val Ala Gln Leu Ile Arg Ser Pro Glu Gly Gly Val Leu Met		
290	295	300
His Gly Pro Thr Phe Met Ala Asn Pro Leu Ala Cys Glu Val Ser His		
305	310	315
Ala Ser Leu Glu Ile Ile Glu Thr Gly Met Trp Gln Lys Gln Val Lys		
325	330	335
Lys Ile Glu Ala Lys Leu Ile Ala Gly Leu Ser Pro Leu Arg Cys Ile		
340	345	350
Pro Gly Val Ala Asp Val Arg Val Leu Gly Ala Ile Gly Val Ile Glu		
355	360	365
Met Glu Gln Asn Val Asn Val Glu Glu Ala Thr Gln Ala Ala Leu Asp		
370	375	380
His Gly Val Trp Ile Arg Pro Phe Gly Arg Leu Leu Tyr Val Met Pro		
385	390	395
Pro Tyr Ile Thr Thr Ser Glu Gln Cys Ala Gln Ile Cys Arg Ala Leu		
405	410	415
His Ala Ala Val Lys Gly Lys		
420		

【請求項8】 次のDNA塩基配列で示されるデスチオ ピオチンシンセターゼをコードする遺伝子DNA断片。

ATGCCATTTC TATTGTCAG CGGCACCGGA ACCGGGGTTG GAAAGACCTT CTCCACAGCC 60
 GTTTGGTTC GTTACTTAGC CGATCAAGGA CACGATGTTG TGCCCGTAAA GCTCGTCAA 120
 ACAGGTGAAC TTCCAGGCGA AGGAGACATC TTCACCATGG AACGTTGAC TGGAATTGCT 180

5	6
GGAGAGGAAT TTGCTCGTTT CAAAGACCCCT CTTGCCCAA ATCTGGCAGC CCGACGAGAG	240
GGGATCGAGC CAATACAGTT TGATCAGATT ATCTCGTGGC TTCTGGTTT TGACGACCCA	300
GATCGCATCA TTGTGGTGGA GGGCGCTGGT GCCTGCTGG TCAGATTAGG GGAAGATITC	360
ACCCCTGGCAG ATCTTGCTC CGCTTGAAT GCACCTTAG TGATTTGGAC AAGCACCGGA	420
TTGGGAAGCC TCAACGCTGC TGAATTAAGC GTTGAGGCAG CAAACCGCCG AGGACTCACA	480
GTGTGGGAG TCCTCGCGG TTGATCCCT CAAAATCTG ATCTAGCTAC GATGCTTAAT	540
CTCGAAGAAT TTGAGAGAGT CACCGGGGTG CCCTTTGGG GAGCTTGCC GGAAGGGTTG	600
TCACCGGGTGG AGGGGTTCTGT CGAAAAGCAA TCTTTCCGG CCCTTGATGC CTITAAGAAA	660
CCGGCCGCCAA GGTGA	675

【請求項9】 次のアミノ酸配列を有するデスチオビオチンシンセターゼをコードする遺伝子DNA断片。

Met Pro Phe Leu Phe Val Ser Gly Thr Gly Thr Gly Val Gly Lys Thr			
1	5	10	15
Phe Ser Thr Ala Val Leu Val Arg Tyr Leu Ala Asp Gln Gly His Asp			
20	25	30	
Val Leu Pro Val Lys Leu Val Gln Thr Gly Glu Leu Pro Gly Glu Gly			
35	40	45	
Asp Ile Phe Thr Ile Glu Arg Leu Thr Gly Ile Ala Gln Glu Glu Phe			
50	55	60	
Ala Arg Phe Lys Asp Pro Leu Ala Pro Asn Leu Ala Ala Arg Arg Glu			
65	70	75	80
Gly Ile Glu Pro Ile Gln Phe Asp Gln Ile Ile Ser Trp Leu Arg Gly			
85	90	95	
Phe Asp Asp Pro Asp Arg Ile Ile Val Val Glu Gln Ala Gln Gly Leu			
100	105	110	
Leu Val Arg Leu Gln Asp Phe Thr Leu Ala Asp Val Ala Ser Ala			
115	120	125	
Leu Asn Ala Pro Leu Val Ile Trp Thr Ser Thr Gly Leu Gly Ser Leu			
130	135	140	
Asn Ala Ala Glu Leu Ser Val Glu Ala Ala Asp Arg Arg Gly Leu Thr			
145	150	155	160
Val Leu Gln Leu Gln Gln Ser Ile Pro Gln Asn Pro Asp Leu Ala			
165	170	175	
Thr Met Leu Asn Leu Gln Glu Phe Glu Arg Val Thr Gly Val Pro Phe			
180	185	190	
Trp Gly Ala Leu Pro Glu Gln Leu Ser Arg Val Glu Gly Phe Val Glu			
195	200	205	
Lys Gln Ser Phe Pro Ala Leu Asp Ala Phe Lys Lys Pro Pro Ala Arg			
210	215	220	

【請求項10】 請求項1～9のいずれかに記載されたDNA断片が導入された組換えプラスミド。

【請求項11】 請求項1～9のいずれかに記載されたDNA断片と、プラスミドpBY503に由来するコリネ型細菌内で複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNA断片及び安定化機能を司る遺伝子を含むDNA断片を保有する組換えプラスミド。

【請求項12】 請求項10～11のいずれかに記載の組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌。

【請求項13】 請求項12記載のコリネ型細菌を培養

し、培養物中にジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及び／又はデスチオビオチンシンセターゼを生成しめることを特徴とするジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及び／又はデスチオビオチンシンセターゼの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオビオチンシンセターゼをコードする遺伝子、該遺伝子を有するDNA断

片を含む組換えプラスミド、該組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌並びに該コリネ型細菌を用いるジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及び／又はデスチオビオチンシンセターゼの製造法に関する。

【0002】ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオビオチンシンセターゼは、7-ケト-8-アミノペラルゴン酸からデスチオビオチンを生成するビオチン生合成反応に係る酵素であり、ビオチン製造において産業上重要な酵素である。

【0003】またビオチンは、ヒト、動物、植物及びある種の微生物の生育に必要とされるビタミンの1種であり、特に皮膚代謝の調整剤として、あるいはヒトの脱毛防止養毛剤として、あるいは、家畜飼料への添加剤として用いられる有用な物質である。

【0004】

【従来の技術】従来、微生物を用いたビオチンの製造法としては、バチルス (*Bacillus*) 属、エシエリヒア (*Escherichia*) 属、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属、クロモバクテリウム (*Chromobacterium*) 属、シードモナス (*Pseudomonas*) 属、アースロバクター (*Aerobacter*) 属等の微生物を用いる方法が知られている。(特開昭56-160998号公報)。またこれら野生株に人工的に突然変異を生起させてビオチン生産能を付与する方法も提案されている(例えば H. Yamagata et al., *Agri. Biol. Chem.*, 47, 1611, 1983)。しかしながら、微生物を用いてビオチンを製造しようとする場合、野生株はビオチンによる強力なフィードバック抑制機構のため(Y. Izumi, K. Ogata, *Adv. Appl. Microbiol.* 22, 155-157, 1977)。ビオチンは極少量しか生成されない。また変異株を用いる方法でも生成量は必ずしも満足し得るものではなかつた。

【0005】また、工業的利用上多くの利点を有するブレビバクテリウム属及びコリネバクテリウム属細菌を含むコリネ型細菌のある種の苗株、例えばブレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ-233、ブレビバクテリウム・ラクトフアーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC 13869、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 31831、ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagenes*) ATCC 13745等は、ビオチン要求性を有しており、ビオチンを全く生産しないことが知られている。

【0006】ビオチンの生合成に関与する遺伝子としては、エシエリヒア・コリ由来の遺伝子がよく研究されており、*bioA*、*bioB*、*bioC*、*bioD*、*bioF*、*bioH*遺伝子が存在することが知られている。このうち、*bioA*は7, 8-ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ、*bioB*はビオチンシンセターゼ、*bioC*はピメリルCoAシンテターゼ、*bioD*はデスチオビオチンシンセターゼ、*bioF*は7-ケ

ト-8-アミノペラルゴン酸シンテターゼをそれぞれコードすることが知られ、*bioH*については、その働きは、まだ明らかでない(A. J. Otsuka et. al., *J. Biol. Chem.* 263, 19577-19585, 1988)。また、*bioA*、*bioB*、*bioC*、*bioD*、*bioF*遺伝子は*bioABCD*なるオペロンを形成しており、その発現は、*bioA*と*bioB*遺伝子の間に存在するオペレーターにより制御されることがわかつている。また、そのオペレーターの制御は*bioR*遺伝子にコードされたビオチンリプレッサーが、ビオチンにより活性化されることによりオペレーターに結合し、ビオチン生合成オペロンの発現を抑制することが知られている。(J. Biol. Chem. 263, 1013-1016, 1988)。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】この発明は、コリネ型細菌のビオチン生合成に関与する遺伝子を解析・単離し、該遺伝子を同種であるコリネ型細菌に導入し、該遺伝子産物を効率的にコリネ型細菌から取得すること目的としてなされたものである。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成すべく銳意研究を重ねた。その結果、ビオチン要求性の大腸菌変異株を用いる交差相補性試験により、ビオチン要求性のコリネ型細菌は、少くとも*bioB*、*bioA*、*bioD*の三種のビオチン生合成に関与する遺伝子を保有していることが明らかとなり、該遺伝子を適当なベクタープラスミドに導入して、コリネ型細菌を形質転換し、該コリネ型細菌を培養することにより、培養物中に効率的にビオチン生合成に関与する酵素が生成することを見い出し本発明を完成するに至つた。

【0009】かくして本発明によれば、(1)コリネ型細菌由来のジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオビオチンシンセターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片、(2)該DNA断片が導入された組換えプラスミド、(3)該組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌、(4)該コリネ型細菌を培養し、培養物中にジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及び／又はデスチオビオチンシンセターゼを生成せしめることを特徴とするジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及び／又はデスチオビオチンシンセターゼの製造法が提供される。

【0010】以下本発明についてさらに詳細に説明する。

【0011】本発明の「ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及び／又はデスチオビオチンシンセターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片」(以下これを「*bioA bioD*断片」と略称することがある)は、7-ケト-8-アミノペラルゴン酸から7, 8-ジアミノペラルゴン酸への変換反応を触媒する酵素、すなわちジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼを

コードする以下 (*b i o A*) 及び/又は 7, 8-ジアミノペラルゴン酸からデスチオビオチンへの変換を触媒する酵素、すなわちデスチオビオチンシンセターゼをコードする遺伝子 (*b i o D*) の両遺伝子又はいずれか一方の遺伝子を含むDNA断片である。

【0012】上記 *b i o A b i o D* 断片の供給源となる微生物は、コリネ型細菌であれば特に限定されるものではないが、一般的には、プレビバクテリウム・フラバム MJ-233 (FERM BP-1497) およびその由来株、プレビバクテリウム・アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagenes*) ATCC 6871、同 A TCC 13745、同 ATCC 13746、プレビバクテリウム・デバリカタム (*Brevibacterium divaricatum*) ATCC 14020、プレビバクテリウム・ラクトフアーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC 13869、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 31831 等が有利に使用される。

【0013】これらの供給源微生物から *b i o A b i o D* 断片を調製するための基本操作の一例を述べれば次のとおりである。

【0014】上記 *b i o A b i o D* 断片は、上記コリネ型細菌、例えばプレビバクテリウム・フラバム MJ-233 株 (FERM BP-1497) の染色体上に存在し、この染色体を適当な制限酵素で切断することにより生ずる切断断片の中から以下に述べる方法で分離、取得することができる。

【0015】先ず、プレビバクテリウム・フラバム MJ-233 株の培養物から染色体DNAを抽出する。この染色体DNAを適当な制限酵素、例えば *Sau 3 A I* を用いて、DNA断片の大きさが約 20~30 kb になるよう部分分解する。

【0016】得られたDNA断片をコスミドベクター例えば pWE 15 に挿入し、このコスミドを、*In vitro Packaging Kit* を用いる形質導入により、*b i o A* あるいは *b i o D* の欠損した大腸菌変異株 (*Journal of Bacteriology*, vol 94, p2065-2066, 1967 及び *Journal of Bacteriology* vol 112, p830-839, 1972 参照) に導入する。この大腸菌変異株を、ビオチンを含まない選択培地に塗沫する。

【0017】得られる形質転換株よりコスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたプレビバクテリウム・フラバム MJ-233 株染色体由来の *b i o A b i o D* 断片を確認・取得することができる。

【0018】かくして得られる *b i o A b i o D* 断片は、大きさが約 20~30 kb と大きく、実用的ないので、さらに短かい断片に特定化する必要がある。

【0019】次に、上記で得られた *b i o A b i o D*

表1

断片を含むコスミドを適当な制限酵素を用いて切断し、得られるDNA断片を、大腸菌で複製可能なベクタープラスミドに挿入しこのベクタープラスミドを通常用いられる形質転換法、例えば、塩化カルシウム法あるいは電気パルス法による形質転換により、前記 *b i o A* あるいは *b i o D* の欠損した大腸菌変異株に導入する。この大腸菌変異株を、ビオチンを含まない選択培地に塗沫する。

【0020】得られる形質転換株よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたプレビバクテリウム・フラバム MJ-233 株染色体由来の *b i o A b i o D* 断片を確認・取得することができる。

【0021】このようにして得られる *b i o A b i o D* 断片の一つは、前記プレビバクテリウム・フラバム MJ-233 株の染色体DNAを制限酵素 *Sau 3 A I* の部分分解により切り出し、さらにそれを、制限酵素 *S a 1 I* で切り出すことによつて得られる大きさが約 4.0 kb のDNA断片を挙げることができる。

【0022】この約 4.0 kb の *b i o A b i o D* 断片を、各種の制限酵素で切断したときの認識部位数及び切断断片の大きさを下記表1に示す。

【0023】なお、本明細書において、制限酵素による「認識部位数」は、DNA断片又はプラスミドを、過剰の制限酵素の存在下で完全分解し、それらの分解物をそれ自体既知の方法に従い 1% アガロースゲル電気泳動およびポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、分離可能な断片の数から決定した値を採用した。

【0024】また、「切断断片の大きさ」及びプラスミドの大きさは、アガロースゲル電気泳動を用いる場合には、エシエリヒア・コリのラムダフアージ (λ phage) のDNAを制限酵素 *Hind III* で切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一アガロースゲル上の泳動距離で描かれる標準線に基づき、また、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いる場合には、エシエリヒア・コリの ϕ AI・エツクス 174 フアージ ($\phi \times 174$ phage) のDNAを制限酵素 *Hae III* で切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一ポリアクリルアミドゲル上の泳動距離で描かれる標準線に基づき、切断DNA断片又はプラスミドの各DNA断片の大きさを算出する。プラスミドの大きさは、切断断片それぞれの大きさを加算して求める。なお、各DNA断片の大きさの決定において、1 kb 以上の断片の大きさについては、1% アガロースゲル電気泳動によつて得られる結果を採用し、約 0.1 kb から 1 kb 未満の断片の大きさについては 4% ポリアクリルアミドゲル電気泳動によつて得られる結果を採用した。

【0025】

【表2】

11

12

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
BamH I	1	0. 8, 3. 2
Dra II	1	1. 2, 2. 8
Sac I	1	1. 8, 2. 2
Xho I	1	1. 3, 2. 7

上記表1中、2.7 kbのXho I切断断片もまたジアミノペラルゴン酸アミノトランスクエラーゼ及びデスチオビオチンシンセターゼをコードする機能を有していることが確認されており、従つて、この切断断片もまた本発明のDNA断片に含まれる。

【0026】かくして、上記したb i o A b i o D DNA断片中に含まれるb i o A b i o Dは、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233染色体DNAを制限*

表 2

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
Sac I	1	0. 9, 1. 8
Dra II	1	1. 5, 1. 2
BamH I	1	1. 9, 0. 8

かくして得られるDNA断片の遺伝子コード機能の解析により、b i o A、b i o Dは、制限酵素Xho I及びSac Iで切り出すことによって得られる2.7 kb中のDNA断片中の、Xho I部位側にb i o A、その下流Sac I部位側にb i o Dの位置関係を有して配列が存在すると考えられる。

【0029】以上に詳述した大きさが約4.0 kb、約2.7 kbのb i o A b i o D DNA断片の制限酵素切断点を図1に示す。

【0030】一方、上記したプレビバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体を、制限酵素Sac Iを用いて切り出すことにより得られる大きさが約4.0 kbのDNA断片を用いて、その塩基配列をプラスミドpUC

*酵素Sac I及びXho Iで切り出すことによつて得られる大きさが約2.7 kbのDNA断片中に含まれるものと考えられる。

【0027】上記約2.7 kbのDNA断片を、さらに10各種の制限酵素で切断したときの認識部位数及び切断断片の大きさを下記表2に示す。

【0028】

【表3】

かくして得られるDNA断片の遺伝子コード機能の解析により、b i o A、b i o Dは、制限酵素Xho I及びSac Iで切り出すことによって得られる2.7 kb中のDNA断片中の、Xho I部位側にb i o A、その下流Sac I部位側にb i o Dの位置関係を有して配列が存在すると考えられる。

【0029】以上に詳述した大きさが約4.0 kb、約2.7 kbのb i o A b i o D DNA断片の制限酵素切断点を図1に示す。

【0030】一方、上記したプレビバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体を、制限酵素Sac Iを用いて切り出すことにより得られる大きさが約4.0 kbのDNA断片を用いて、その塩基配列をプラスミドpUC

18またはpUC19を用いるジデオキシヌクレオチド

酵素法(dideoxy chain termination法)(Sanger, F. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463, 1977)により決定することができる。

【0031】かくして、塩基配列中のオープンリーデングフレームの存在から決定されたジアミノペラルゴン酸アミノトランスクエラーゼをコードする遺伝子(b i o A)は、次の配列番号1で示される配列を有する423のアミノ酸をコードする1269の塩基対より構成され、またデスチオビオチンシンセターゼをコードする遺伝子(b i o D)は、次の配列番号2で示される配列を有する224のアミノ酸をコードする672の塩基対より構成される：

配列番号：1

ATG GAA AAC CCC AGC TTG CGC GAG CTT GAT CAC CGA AAC ATC TGG CAC	48
Met Glu Asn Pro Ser Leu Arg Glu Leu Asp His Arg Asn Ile Trp His	
1 5 10 15	
CCG TAT GCC GCG CGG CGC GTG CGC AAC AGA CTC GTC ACC AAC ACT GAT	96
Pro Tyr Ala Ala Pro Gly Val Arg Asn Arg Leu Val Thr Asn Thr Asp	
20 25 30	
GGG GTG TTC TTG ACG CTG GAA GAT GGC AGC ACC GTG ATT GAC CCG ATG	144
Gly Val Phe Leu Thr Leu Glu Asp Gly Ser Thr Val Ile Asp Ala Met	
35 40 45	
AGC TCC TGG TGG TCG GCA ATT CAT GGA CAC GGA CAC CCC CGA CTG AAA	192
Ser Ser Trp Trp Ser Ala Ile His Gly His Gly His Pro Arg Leu Lys	
50 55 60	
CGT GCC GCC CAA AAA CAA ATC GAC ACC ATG AGT CAC GTC ATG TTC GGC	240
Arg Ala Ala Glu Lys Glu Ile Asp Thr Met Ser His Val Met Phe Gly	
65 70 75 80	
GGA CTA ACC CAC GAG CCC ATT AAG CTC ACC CAC AAA CTC CTC AAT	288
Gly Leu Thr His Glu Pro Ala Ile Lys Leu Thr His Lys Leu Leu Asn	
85 90 95	

13	14		
CTC ACT GGC AAT GCC TTT GAC CAC GTC TTT TAT TCC GAT TCG GGC TCG	336		
Leu Thr Gly Asn Ala Phe Asp His Val Phe Tyr Ser Asp Ser Gly Ser			
100	105	110	
GTC TCG GTG GAG GTC GCC ATC AAA ATG GCA CTG CAG GCC TCC AAA GGA	384		
Val Ser Val Glu Val Ala Ile Lys Met Ala Leu Gin Ala Ser Lys Gly			
115	120	125	
CAA GGC CAC CGG GAA CGC ACA AAA CTC CTC ACC TGG CGG TCC GGC TAC	432		
Gln Gly His Pro Glu Arg Thr Lys Leu Leu Thr Trp Arg Ser Gly Tyr			
130	135	140	
CAC GGA GAC ACA TTC ACC CGG ATG AGC GTG TGC GAC CCA GAA AAT GGC	480		
His Gly Asp Thr Phe Thr Ala Met Ser Val Cys Asp Pro Glu Asn Gly			
145	150	155	160
ATG CAT AGC CTC TGG AAA GGC ACA CTC CCC GAG CAG ATT TTC GCC CCC	528		
Met His Ser Leu Trp Lys Gly Thr Leu Pro Glu Gln Ile Phe Ala Pro			
165	170	175	
GCC CCA CCA GTT CGG CGG TCA TCG CGG CAG GCA ATT TCC GAG TAC CTG	576		
Ala Pro Pro Val Arg Gly Ser Ser Pro Gln Ala Ile Ser Glu Tyr Leu			
180	185	190	
CAC AGC ATG GAA TTG CTT ATC GAC GAG ACC GTC TCC GCA ATC ATC ATC	624		
His Ser Met Glu Leu Leu Ile Asp Glu Thr Val Ser Ala Ile Ile Ile			
195	200	205	
GAA CCG ATC GTC CAA GGC GCT GGA GGC ATG CGC TTT CAC GAT GTC GCA	672		
Glu Pro Ile Val Gln Gly Ala Gly Gly Met Arg Phe His Asp Val Ala			
210	215	220	
CTC ATT GAA GGA GTC CGG GCA CTG TGC AAG AAG CAC GAT CGT TTC TTG	720		
Leu Ile Glu Gly Val Ala Ala Leu Cys Lys Lys His Asp Arg Phe Leu			
225	230	235	240
ATC GTC GAT GAA ATT GCC ACC GGT TTC GGC CGC ACC GGT GAA CTA TTT	768		
Ile Val Asp Glu Ile Ala Thr Gly Phe Gly Arg Thr Gly Glu Leu Phe			
245	250	255	
GCC ACG TTA ACC AAT GGC GTA CAA CCA GAC ATC ATG TGT GTG GGC AAG	816		
Ala Thr Leu Ser Asn Gly Val Gln Pro Asp Ile Met Cys Val Gly Lys			
260	265	270	
GCC CTC ACC GGT GGA TTC ATG TCT TTT GCC GCC ACT GTA TGC ACG GAC	864		
Ala Leu Thr Gly Gly Phe Met Ser Phe Ala Ala Thr Val Cys Thr Asp			
275	280	285	
AAG GTG GCT CAA TTG ATC AGA TCC CCA GAA GGC GGA GGT GTG CTG ATG	912		
Lys Val Ala Gln Leu Ile Arg Ser Pro Glu Gly Gly Val Leu Met			
290	295	300	
CAT GGC CCC ACC TTT ATG GCT AAT CCT CTG GCC TGT GAG GTT TCG CAC	960		
His Gly Pro Thr Phe Met Ala Asn Pro Leu Ala Cys Glu Val Ser His			
305	310	315	320
GCT TCG CTA GAA ATC ATT GAG ACC GGC ATG TGG CAG AAA CAG GTT AAA	1008		
Ala Ser Leu Glu Ile Ile Glu Thr Gly Met Trp Gln Lys Gln Val Lys			
325	330	335	
AAA ATC GAA GCC AAA CTT ATC GCA GGC CTT TCC CCA CTT CGA TGT ATT	1056		
Lys Ile Glu Ala Lys Leu Ile Ala Gly Leu Ser Pro Leu Arg Cys Ile			
340	345	350	
CCA GGA GTT GCC GAT GTC CGG GTT CTC GGC GCG ATT GGC GTC ATC GAA	1104		
Pro Gly Val Ala Asp Val Arg Val Leu Glu Ala Ile Glu Val Ile Glu			

15

355

360

365

ATG GAA CAA AAT GTG AAT GTC GAA GAA GCC ACT CAG GCT GCA TTA GAT 1152
 Met Glu Gln Asn Val Asn Val Glu Glu Ala Thr Gln Ala Ala Leu Asp
 370 375 380
 CAC GGT GTG TGG ATC CGC CCC TTT GGA CGC TTG CTC TAT GTC ATG CCC 1200
 His Gly Val Trp Ile Arg Pro Phe Gly Arg Leu Leu Tyr Val Met Pro
 385 390 395 400
 CCA TAT ATC ACC ACC TCA GAG CAA TGC GCA CAG ATC TGC CGC GCG CTT 1248
 Pro Tyr Ile Thr Thr Ser Glu Gln Cys Ala Glu Ile Cys Arg Ala Leu
 405 410 415
 CAT GCT GCA GTT AAA GGA AAA TAA 1272
 His Ala Ala Val Lys Gly Lys
 420

16

配列番号：2

ATG CCA TTT TTA TTT GTC AGC GGC ACC GGA ACC GGG GTT GGA AAG ACC 48
 Met Pro Phe Leu Phe Val Ser Gly Thr Gly Thr Gly Val Gly Lys Thr
 1 5 10 15
 TTC TCC ACA GCC GTT TTG GTT CGT TAC TTA GCC GAT CAA GGA CAC GAT 96
 Phe Ser Thr Ala Val Leu Val Arg Tyr Leu Ala Asp Gln Gly His Asp
 20 25 30
 GTT CTG CCC GTA AAG CTC GTC CAA ACA GGT GAA CTT CCA GGC GAA GGA 144
 Val Leu Pro Val Lys Leu Val Gln Thr Gly Glu Leu Pro Gly Glu Gly
 35 40 45
 GAC ATC TTC ACC ATT GAA CGC TTG ACT GGA ATT GCT GGA GAG GAA TTT 192
 Asp Ile Phe Thr Ile Glu Arg Leu Thr Gly Ile Ala Gly Glu Glu Phe
 50 55 60
 GCT CGT TTC AAA GAC CCT CTT CGG CCA AAT CTG GCA GGC CGA CGA GAG 240
 Ala Arg Phe Lys Asp Pro Leu Ala Pro Asn Leu Ala Ala Arg Arg Glu
 65 70 75 80
 GGG ATC GAG CCA ATA CAG TTT GAT CAG ATT ATC TCG TGG CTT CGT GGT 288
 Gly Ile Glu Pro Ile Gln Phe Asp Gln Ile Ile Ser Trp Leu Arg Gly
 85 90 95
 TTT GAC GAC CCA GAT CGC ATC ATT GTG GTG GAG GGC GCT GGT GGC CTG 336
 Phe Asp Asp Pro Asp Arg Ile Ile Val Val Glu Gly Ala Gly Gly Leu
 100 105 110
 CTG GTC AGA TTA GGG GAA GAT TTC ACC CTG GCA GAT GTT GGC TCC GCT 384
 Leu Val Arg Leu Gly Glu Asp Phe Thr Leu Ala Asp Val Ala Ser Ala
 115 120 125
 TTG AAT GCA CCC TTA GTG ATT TGG ACA AGC ACC GGA TTG GGA AGC CTC 432
 Leu Asn Ala Pro Leu Val Ile Trp Thr Ser Thr Gly Leu Gly Ser Leu
 130 135 140
 AAC GCT GCT GAA TTA AGC GTT GAG GCA GCA AAC CCC CGA GGA CTC ACA 480
 Asn Ala Ala Glu Leu Ser Val Glu Ala Ala Asn Arg Arg Gly Leu Thr
 145 150 155 160
 GTG TTG GGA GTC CTC CGC GGT TCG ATC CCT CAA AAT CCT GAT CTA GCT 528
 Val Leu Gly Val Leu Gly Gly Ser Ile Pro Gln Asn Pro Asp Leu Ala
 165 170 175
 ACG ATG CTT AAT CTC GAA GAA TTT GAG AGA GTC ACC GGC GTG CCC TTT 576
 Thr Met Leu Asn Leu Glu Glu Phe Glu Arg Val Thr Gly Val Pro Phe
 180 185 190

17

TGG GGA GCT TTG CCG GAA GGG TTG TCA CGG GTG GAG GGG TTC GTC GAA 624
 Trp Gly Ala Leu Pro Glu Gly Leu Ser Arg Val Glu Gly Phe Val Glu
 195 200 205
 AAG CAA TCT TTT CCG GCC CTT GAT CCC TTT AAG AAA CGG CGG GCA AGG 672
 Lys Gln Ser Phe Pro Ala Leu Asp Ala Phe Lys Lys Pro Pro Ala Arg
 210 215 220
 TGA 675

18

上記の塩基配列を包含して成る本発明のジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及び／又はデスチオピオチンシンセターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片は、天然のコリネ型細菌染色体DNAから分離されたもののみならず、通常用いられるDNA合成装置、例えばベツクマン社製System-1Plusを用いて合成されたものであつてもよい。

【0032】また前記の如くブレビバクテリウム・フラバムM J - 233の染色体DNAから取得される本発明のDNA断片は、ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及び／又はデスチオピオチンシンセターゼをコードする機能を実質的に損なうことがない限り、塩基配列の一部の塩基が他の塩基と置換されていてもよく又は削除されていてもよく、或いは新たに塩基が挿入されていてもよく、さらに塩基配列の一部が転位されているものであつてもよく、これらの誘導体のいずれもが、本発明のbioA bioD断片に包含される。

【0033】本発明のbioA bioD断片は、コリネ型細菌でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を少くとも含むプラスミドベクターに導入することにより、コリネ型細菌でジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及び／又はデスチオピオチンシンセターゼの高発現可能な組換えプラスミドを得ることができる。

【0034】本発明のbioA bioD断片を導入することができる、コリネ型細菌内の複製増殖機能を司る遺伝子を少くとも含むプラスミドベクターとしては、特願平2-4212号明細書に開示されているプラスミドpCRY30；特願平2-276575号公報に記載されているプラスミドpCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY3K7、pCRY3KE、pCRY3KX；特願平1-191686号公報に記載されているプラスミドpCRY2及びpCRY3；特開昭58-67679号公報に記載のpAM330；特開昭58-77895号公報に記載のpHM1519；特開昭58-192900号公報に記載のpAJ655、pAJ611及びpAJ1844；特開昭57-134500号に記載のpCG1；特開昭58-35197号公報に記載のpCG2；特開昭57-183799号公報に記載のpCG4及びpCG11等を挙げることができる。

【0035】これらの中でもコリネ型細菌の宿主ベクター系で用いられるプラスミドベクターとしては、コリネ

10 型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子とコリネ型細菌内でプラスミドの安定化機能を司る遺伝子とをもつものが好ましく、例えばプラスミドpCRY30、pCRY21、pCRY2KE、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY3K7、pCRY3KE、pCRY3KXが好適に使用される。

【0036】上記プラスミドベクターpCRY30を調製する方法としては、ブレビバクテリウム・スタチオニス(*Brevibacterium stationis*) IF012144(FERM BP-2515)からプラスミドpBY503DNAを抽出(このプラスミドの詳細は特開平1-9520785号公報参照)し、制限酵素XholIで大きさが約4.0kbのプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNA断片を切り出し、制限酵素EcoRIおよびKpnIで大きさが約2.1kbのプラスミドの安定化機能を司る遺伝子を含むDNA断片を切り出す。これらの両断片をプラスミドpHSG298(宝酒造製)のEcoRI、KpnI部位及びSalI部位に組み込むことにより、プラスミドベクターpCRY30を調製することができる。

【0037】次に、上記プラスミドベクターへの本発明のbioA bioD断片の導入は、例えばプラスミドベクター中に1個所だけ存在する制限酵素部位を、該制限酵素で開裂し、そこに本発明のbioA bioD断片を、必要に応じてS1ヌクレアーゼで処理して平滑末端とするか、または適当なアダプターDNAの存在下に、DNAリガーゼ処理で連絡させることにより行うことができる。

【0038】具体的には、例えば前記プラスミドpCRY30を制限酵素XholIで開裂させ、そこに前記制限酵素SalIを用いて切り出すことにより得られる大きさが約4.0kbのbioA bioD断片を、DNAリガーゼで連結することにより行うことができる。

【0039】このようにして造成されるプラスミドpCRY30に本発明の大きさが約4.0kbのDNA断片を導入した組換えプラスミドは、ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオピオチンシンセターゼの製造に好適に用いることができる組換えプラスミドの一つであり、本発明者らはこれをプラスミドpCRY30-bio3と命名した。プラスミドpCRY30-bio3の造成については、後記実施例3及び4においてさらに詳細に説明する。

【0040】このプラスミドpCRY30-bio3の制限酵素切断点地図を図2に示す。このようにして造成されるbioA bioDを含むコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラスミドを、宿主微生物に導入し培養することにより、ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオビオチンシンセターゼを安定に効率よく生産することが可能となる。

【0041】本発明によるプラスミドで形質転換しうる宿主微生物としては、コリネ型細菌、例えばプレビパクテリウム・フラバムMJ-233(FERM BP-1497)、プレビパクテリウム・フラバムMJ-233-AB-41(FERM BP-1498)、プレビパクテリウム・フラバムMJ-233-ABT-11(FERM BP-1500)、プレビパクテリウム・フラバムMJ-233-ABD-21(FERM BP-1499)等が挙げられる。

【0042】なお、上記のFERM BP-1498の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としてDL- α -アミノ酪酸耐性を積極的に付与されたエタノール資化性微生物である(特公昭59-28398号公報第3~4欄参照)。また、FERM BP-1500の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としたL- α -アミノ酪酸トランスアミナーゼ高活性変異株である(特開昭62-51998号公報参照)。さらに、FERM BP-1499の菌株はFERM BP-1497の菌株を親株としたD- α -アミノ酪酸デアミナーゼ高活性変異株である(特開昭61-177993号公報参照)。

【0043】これらの微生物の他に、プレビパクテリウム・アンモニアゲネス(*Brevibacterium ammoniagenes*)ATCC6871、同ATCC13745、同ATCC13746、プレビパクテリウム・デバリカタム(*Brevibacterium divaricatum*)ATCC14020、プレビパクテリウム・ラクトフアーメンタム(*Brevibacterium lactofermentum*)ATCC13869、コリネパクテリウム・グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*)ATCC31831等を宿主微生物として用いることもできる。

【0044】なお宿主としてプレビパクテリウム・フラバムMJ-233由来の菌株を用いる場合、本菌株が保有するプラスミドpBY502(特開昭63-36787号公報参照)のため、形質転換が困難である場合があるので、そのような場合には、本菌株よりプラスミドpBY502を除去することが望ましい。そのようなプラスミドpBY502を除去する方法としては、例えば、継代培養を繰り返すことにより、自然に消失させることも可能であるし、人为的に除去することも可能である「Bact. Rev. 36 p. 361~405(1972)参照」。上記プラスミドpBY502を人为的に除去する方法の一例を示せば次のとおりである。

【0045】宿主プレビパクテリウム・フラバムMJ-233の生育を不完全に阻害する濃度のアクリジンオレンジ(濃度:0.2~50μg/ml)もしくはエチジウムプロミド(濃度:0.2~50μg/ml)等を含む培地に、1ml当り約10細胞になるように植菌し、生育を不完全に阻害しながら、約24時間約35℃で培養する。培養液を希釈後寒天培地に塗布し、約35℃で約2日培養する。出現したコロニーから各々独立にプラスミド抽出操作を行い、プラスミドpBY502が除去されてている株を選択する。この操作によりプラスミドpBY502が除去されたプレビパクテリウム・フラバムMJ-233由来菌株が得られる。

【0046】このようにして得られるプレビパクテリウム・フラバムMJ-233由来菌株への前記プラスミドの形質転換法としては、DNA受容菌にパルス波を通電することによりプラスミドを導入することが可能である

[Satoh, Y. et al, Journal of Industrial Microbiology, 5, 159(1990)参照]。

【0047】上記の方法で形質転換して得られるジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及び/又はデスチオビオチンシンセターゼ産生能を有するコリネ型細菌、例えばプレビパクテリウム・フラバムMJ-233由来株の培養方法を以下に述べる。

【0048】培養は炭素源、窒素源、無機塩等を含む通常の栄養培地で行なうことができ、炭素源としては、例えばグルコース、エタノール、メタノール、瓈糖蜜等が、そして窒素源としては、例えばアンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿素等がそれぞれ単独もしくは混合して用いられる。また無機塩としては、例えばリン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム等が用いられる。この他にベプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステイーブリカー、カザミノ酸、ビオチン等の各種ビタミン等の栄養素を培地に添加することができる。

【0049】培養は、通常、電気攪拌、振とう等の好気的条件下に、約20~40℃、好ましくは25~35℃の温度で行なうことができる。培養途中のpHは5~10、好ましくは7~8付近で行い、培養中のpHの調整は酸又はアルカリを添加して行なうことができる。

【0050】培養開始時の炭素源濃度は、好ましくは1~5容量%、更に好ましくは2~3容量%である。また、培養期間は通常1~7日間とすることができ、最適期間は3日間である。

【0051】このようにして得られる培養物から遠心分離等により菌体を取得することができる。

【0052】かくして培養された菌体は、野生株を培養した場合に比べてジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及び/又はデスチオビオチンシンセターゼをその菌体内に多量に含有している。

【0053】菌体内に產生された、ジアミノペラルゴン

21

酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオビオチンシンセターゼの含量を調べる方法としては、例えば超音波処理、酵素処理、ホモジナイズ等の通常用いられる手段にて破碎し得られる無細胞抽出液を、SDSゲル電気泳動法【例えば、「蛋白質・酵素の基礎実験法」南江堂刊、314～333頁等参照】に付することにより、菌体内の蛋白質を分離した後、Coomassie Brilliant Blue R-250による染色法あるいは、銀染色法により染色した後、例えばファルマシア社製 Ultra Scan XL レーザーデンシトメーターを用いることにより、菌体中の各種タンパク質量を測定することができる。かくして、菌体内に產生された、ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及び／又はデスチオビオチンシンセターゼ含量の増加を測定することができる。

【0054】上記の如くジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及び／又はデスチオビオチンシンセターゼを高含量含む菌体を用い、少なくともケトアミノペラルゴン酸を含有する前記通常の栄養培地で培養することにより、高効率でビオチンを製造することができる。

【0055】本明細書では、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233からジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及び／又はデスチオビオチンシンセターゼをコードする遺伝子(bioA bioD)を含むDNA断片を単離し、該DNA断片を導入した組換えプラスミドと同じくプレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来株へ導入し、該微生物によるジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及び／又はデスチオビオチンシンセターゼの生産能の向上について主として例示したが、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来株の代りに他のコリネ型細菌を用いても本発明の目的は達成される。

【0056】いわゆるコリネ型細菌は、コリネバクテリウム属やプレビバクテリウム属等の種々の属名、種々の菌名が付されているが主な菌学的性質を同じくしている。これらの菌群は、細胞壁のアミノ酸構成やDNAの塩基組成が画一的であり、菌種間には70～80%のDNAの相同性があり、非常に近縁な微生物であることは明らかである(Report of the Fermentation Research Institutes No.55, P.1-5, 1980, International Journal of Systematic Bacteriology Vol. 31, P.131-138, 1981参照)。

【0057】また、ビオチン要求性のコリネ型細菌、例えばプレビバクテリウム・フラバムMJ-233(FERM BP-1497)、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869およびコリネバクテリウム・グルタミカムATCC31831について、ビオチン合成に関与する各ステップの遺伝子が欠損したビオチン要求性大腸菌変異株(Journal of Bacteriology, vol 112, p830-839, 1972およびJournal of Bacteriology, vol 94, p2065-2066, 1967参照)との交差相補

10

性試験(Journal Bacteriology, vol 96, p515-524, 1968参照)により、そのビオチン合成系路について検討した結果、これら3種の菌株は同様にビメリルCoAシンセターゼをコードする遺伝子(bioC)および7-ケト-8-アミノペラルゴン酸シンテターゼをコードする遺伝子(bioF)が欠損しており、また少くとも7, 8-ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼをコードする遺伝子(bioA)、デスチオビオチンシンセターゼをコードする遺伝子(bioD)およびビオチンシンセターゼをコードする遺伝子(bioB)を保有していることが明らかとなつた。

【0058】これらの事実を踏まえれば、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233のみならず、コリネ型細菌全般から単離されたジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及び／又はデスチオビオチンシンセターゼをコードする遺伝子(bioA及び／又はbioD)を含むDNA断片も本発明の範囲に含まれ、また、本発明のプラスミドで形質転換し得る宿主微生物は、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233に限らず、コリネ型細菌が全て含まれることは明らかである。

20

【0059】
【実施例】以上に本発明を説明してきたが、下記の実施例によりさらに具体的に説明する。しかしながら、実施例は本発明の具体的に認識を得る一助とみなすべきものであり、本発明の範囲を限定するためのものではないことを理解しなければならない。

20

【0060】
【実施例1】コリネ型細菌とビオチン要求性大腸菌変異株との相補性試験

30

(A) コリネ型細菌を含有するビオチン欠乏最少培地ブレートの作成

半合成培地A培地(組成:尿素2g、(NH₄)₂SO₄ 7g、K₂HPO₄ 0.5g、KH₂PO₄ 0.5g、MgSO₄ 0.5g、FeSO₄·7H₂O 6mg、MnSO₄·4~6H₂O 6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ビオチン200μg、塩酸チアミン200μg、グルコース20g、純水1リットル)1リットルに、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233(FERM BP-1497)を植菌してO.D.が約2.9になるまで培養し、菌体を集め、得られた菌体をBM緩衝液[組成:尿素2g、(NH₄)₂SO₄ 7g、K₂HPO₄ 0.5g、KH₂PO₄ 0.5g、MgSO₄ 0.5g]で2回洗浄した。この菌体を10mlのBM緩衝液に懸濁し、その内1mlを、滅菌後、50℃に放置しておいたビオチン検定用C培地(尿素0.2%、硫酸アンモニウム0.7%、KH₂PO₄ 0.05%、K₂HPO₄ 0.05%、MgSO₄·7H₂O 0.05%、FeSO₄·7H₂O 6ppm、MnSO₄·4~6H₂O 6ppm、チアミン・HCl 100μg/リットル、ビタミン・ツツセイ用カザミノ酸0.1%、グルコース0.2%、寒天

40

1.0%)に添加し、攪拌後、プレートに流し、固化した。

【0061】同様にして、プレビパクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) の代わりに、プレビパクテリウム・ラクトフアーメンタムATCC13869、あるいは、コリネパクテリウム・グルタミカムATCC31831を用いて各種のコリネ型細菌を含んだビオチン欠乏最少培地プレートを作製した。

(B) ビオチン要求性大腸菌変異株との相補性試験

ビオチン生合成系路の各ステップの欠損したビオチン要求性大腸菌変異株と各種コリネ型細菌との相補性試験により、各種コリネ型細菌のビオチン生合成系路を推定することができる。

【0062】上記(A)項で作製した、3種のコリネ型細菌含有ビオチン欠乏最少培地のプレートに、各種ビオチン要求性大腸菌変異株を線状に植菌した。用いたビオチン要求性大腸菌変異株は、エシエリヒア・コリ(Escherichia Coli) R873 (bioA4)、同R874 (bioF12)、同R875 (bioB17)、同R876 (bioC18)、同R877 (bioD19)である〔()内は各菌株の遺伝子型(Genotype)を示す、またこれらの菌株の詳細および取得方法については、Journal of Bacteriology, vol 94, p2065-2066 (1972)、Journal of Bacteriology, vol 112, p830-839 (1972) 参照〕。

【0063】これらのビオチン要求性大腸菌変異株とコリネ型細菌が相補した場合は、コリネ型細菌がビオチン欠乏最小培地のプレート中に生育し、黄色いコロニーを形成する。各種ビオチン要求性大腸菌変異化物に対応するコリネ型細菌のコロニー形成の有無により、コリネ型細菌がビオチン生合成に関与する遺伝子のどの部分を欠損し、どの部分を保有しているか容易に判別することができる。

【0064】本相補試験の結果、プレビパクテリウム・フラバムMJ-233 (FERNBP-1497)、プレビパクテリウム・ラクトフアーメンタムATCC13869、コリネパクテリウム・グルタミカムATCC31831は、各菌株共、エシエリヒア・コリR873 (bioA4)、同R875 (bioB17)、同R877 (bioD19)を相補したが、同R874 (bioF12)、同R876 (bioC18)を相補しなかつた。即ち、各々のコリネ型細菌は、少なくとも、同様に7, 8-ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼをコードする遺伝子(bioA)、デスチオビオチンシンセターゼをコードする遺伝子(bioD)およびビオチンシンセターゼをコードする遺伝子(bioB)を有していることが明らかとなつた。

【0065】

【実施例2】プレビパクテリウム・フラバムMJ-233由来のジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ

ゼ及びデスチオビオチンシンセターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片(bioA bioD断片)のクローニング

(A) プレビパクテリウム・フラバムMJ-233の全DNAの抽出

半合成培地A培地【組成: 尿素2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7g、 K_2HPO_4 0.5g、 KH_2PO_4 0.5g、 MgSO_4 0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$ 6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ビオチン200μg、塩酸チアミン200μg、グルコース20g、純水1リットル】1リットルに、プレビパクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) を対数増殖期後期で培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む10mM NaCl-20mMトリス緩衝液(pH 8.0)-1mMEDTA-2Na溶液1.5mlに懸濁した。次にプロテナーゼKを、最終濃度が100μg/mlになるように添加し、37℃で1時間保温した。さらにドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が0.5%になるように添加し、50℃で6時間保温して溶菌した。この溶菌液に、等量のエタノール/クロロホルム溶液を添加し、室温で10分間ゆるやかに振とうした後、全量を遠心分離(5,000×g、20分間、10~12℃)し、上清画分を分取し、酢酸ナトリウムを0.3Mとなるように添加した後、2倍量のエタノールをゆっくりと加えた。水層とエタノール層の間に存在するDNAをガラス棒でまきとり、70%エタノールで洗浄した後、風乾した。得られたDNAに10mMトリス緩衝液(pH 7.5)-1mMEDTA-2Na溶液5mlを加え、4℃で一晩静置し、以後の実験に用いた。

【0066】(B) 組換え体の創製

上記(A)項で得たプレビパクテリウム・フラバムMJ-233の全DNA90μlを制限酵素Sau3AI 1unitを用い、37℃で20分間反応させ部分分解した。この部分分解DNAにコスミドpWE15 (ストラタジーン社製) を制限酵素BamHIで切断した後、脱リン酸化処理したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH 7.6)、10mMジチオスレイトール、1mMATP、10mM MgCl₂及びT4 DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、4℃で15時間反応させ、結合させた。

【0067】(C) ビオチン生合成に関与する酵素をコードする遺伝子を含むコスミドの選抜

上記(B)項で得たコスミド混液を用い、前記エシエリヒア・コリR873 (bioA4) 株を形質導入し、アンピシリン50mgを含む選択培地 [K_2HPO_4 7g、 KH_2PO_4 2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g、カザミノ酸10g、グルコース2g及び寒天16gを蒸留水1リットルに溶解] に塗沫した。なお形質導入には、宝酒造より販売されているDN

A *invitro* Packaging Kit を用いて行つた。培地上の生育株を常法により、液体培養し、培養液よりコスミドDNAを抽出し、該コスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、コスミド pWE 15 の長さ 8.8 kb の DNA 断片に加え、長さ約 3.0 kb の DNA 断片が認められた。本コスミドを pWE 15-bioA と命名した。

【0068】 (D) bioA bioD 断片のプラスミド pBluescript II へのサブクローニング

上記 (C) 項で得たコスミド pWE 15-bioA に含まれる DNA 插入断片は約 3.0 kb と大きく、実用的でないで、得られた断片のうち必要な部分だけに小型化するために、プラスミド pBluescript II (ストラタジーン社より市販) ヘジアミノペラルゴン酸アミノトランスクエラーゼ及びデスチオビオチニシンセターゼをコードする遺伝子 (bioA bioD) を含む DNA 断片を下記のとおりサブクローニングした。

【0069】 上記 (C) 項で得たコスミド pWE 15-bioA を制限酵素 Sall で切断したものと、プラスミド pBluescript II を制限酵素 Sall で切断したものを混合し、5.0 mM トリス緩衝液 (pH 7.6)、1.0 mM デチオスレイトール、1 mM ATP、1.0 mM MgCl₂ 及び T4 DNA リガーゼ 1 unit の各成分を添加し (各成分の濃度は最終濃度である)、12°C で 15 時間反応させ、結合させた。

【0070】 得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法 (Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970) に従いエシリヒア・コリ R 873 (bioA 4) 株を形質転換し、アンピシリン 50 mg を含む選択培地

[K₂HPO₄ 7 g, KH₂PO₄ 2 g, (NH₄)₂SO₄ 1 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.1 g, カザミノ酸 *]

表3 プラスミド pBS-bioAD4

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
Hind III	1	6.95
Xba I	2	4.25, 2.7
BamHI	2	3.75, 3.2

上記の制限酵素により特徴づけられるプラスミドを pBS-bioAD4 と命名した。

【0074】 以上の結果より、制限酵素 Sall で切り出される、ジアミノペラルゴン酸アミノトランスクエラーゼとデスチオビオチニシンセターゼをコードする遺伝子を含む長さ 4.0 kb の DNA 断片を得ることができた。

【0075】

【実施例3】 bioA 及び bioD の塩基配列の決定

(A) デレーションミュータントの作製

実施例2の (C) 項で得られたプラスミド pBS-bioAD4 30 μg を制限酵素 Xba I を用いて、37°C、1 時間反応により切断した。この反応液を 75°C で 15 分間加熱して、制限酵素を失活させたのち、1 mM H₂O₂ を加え室温で 10 分間反応させた。反応液と同量のエタノール／クロロホルム (1 : 1) で切

* 1.0 g、グルコース 2 g 及び寒天 1.6 g を蒸留水 1 リットルに溶解] に塗沫した。

【0071】 この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミド DNA を抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミド pBluescript II の長さ 3.9 5 kb の DNA 断片に加え、長さ 4.0 kb の挿入 DNA 断片が認められた。このプラスミドを用い、上記方法に従い前記エシリヒア・コリ R 877 (bioD 19) 株を形質転換し、アンピシリン 50 mg を含む選択培地 [K₂HPO₄ 7 g, KH₂PO₄ 2 g, (NH₄)₂SO₄ 1 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.1 g, カザミノ酸 1.0 g, グルコース 2 g 及び寒天 1.6 g を蒸留水 1 リットルに溶解] に塗沫した。

【0072】 この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミド DNA を抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、エシリヒア・コリ R 873 (bioA 4) 株の形質転換体から得られたプラスミドと全く同様に、プラスミド pBluescript II の長さ 2.95 kb の DNA 断片に加え、長さ約 4.0 kb の挿入 DNA 断片が認められた。長さ約 4.0 kb の DNA 断片を各種の制限酵素で切断したときの制限酵素認識部位数および切断断片の大きさは、前記表 1 に示したとおりであつた。この DNA 断片の制限酵素切断点地図を図 1 に示す。また上記で得られたプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表 3 に示す。

【0073】

【表4】

tRNA-dNTP を 2 μl、クレノー断片 (Klenow fragment) 5 units を加え室温で 10 分間反応させた。反応液と同量のエタノール／クロロホルム (1 : 1) で切断断片を抽出したのち、2.5 倍量のエタノールを加え DNA を沈殿させた。遠心分離後、真空乾燥し、DNA を回収した。この DNA を溶解し、制限酵素 EcoRI で 37°C 1 時間反応により切断した。この溶液から同量のエタノール／クロロホルム (1 : 1) で DNA を抽出したのち、2.5 倍量のエタノールを加え DNA を沈殿させ、遠心分離後、真空乾燥し、DNA を回収した。

【0076】 得られた DNA を 100 μl の Exo III 1 パッファー [5.0 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.0 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1.0 mM β-メルカプトエタノール] に溶解した。この DNA 溶液に

27

180 unitsのエキソヌクレアーゼIIIを加えボルテックスにてかくはんし、37℃にてインキュベートした。この溶液を1分毎に10μlずつサンプリングし、予め準備した100μlのMBヌクレアーゼバッファー（40mM酢酸ナトリウムpH4.5、100mM NaCl、10%グリセロール）中へ順次加え、65℃、5分間の処理によりエキソヌクレアーゼIIIを失活させたのち37℃にもどし、50unitsのMung Beanヌクレアーゼを加え30分間インキュベートした。同量の10mM Tris-HCl-1mM EDTA飽和エノールで1回上清をクロロホルム/イソアミルアルコール（2:1）で1回、DNAをそれぞれ抽出した。上清を別のチューブに移し、2.5倍量のエタノールを加え遠心分離にて沈殿を回収し、70%エタノールで洗浄したのち真空乾燥した。

【0077】得られたDNAを、50μlのクレノー（Klenow）がバッファー[7mM Tris-HCl pH 7.5、0.1mM EDTA、20mM NaCl、7mM MgCl₂、0.1mM dNTPs]に溶解させた後、2unitsのクレノー断片を加え、37℃、15分間インキュベートした。この溶液に2.5倍量のエタノールを加え、遠心分離にて沈殿を回収し、70%エタノールで洗浄後、真空乾燥した。

【0078】得られた沈殿を40μlのTEバッファーに溶解し、10mM ジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl₂およびT4リガーゼ5unitsの各成分を添加し、12℃で15時間反応させ結合させた。

【0079】得られたDNAミクスチャーを用い、エシエリヒア・コリJH109（宝酒造製）を形質転換し、アンビシリン（50mg/ml）を含むLB培地[10g Tryptone, 5g Yeast Extract, 5g NaCl 16g agar per 1L]に塗沫した。

【0080】生育したコロニーよりプラスミドを抽出し、インサートDNAの大きさをしらべ、インサートの大きさが200bp~4kbまで約250bpおきに20クローンを選抜した。

【0081】同様にして逆方向のクローンについても20クローン選抜した。

【0082】(B) デレーションミュータントによる大腸菌変異株の相補性試験

上記(A)項で得たデレーションミュータントプラスミドを、実施例1の(D)項に示す方法に従ってエシエリシア・コリR873(b1oA4)株およびR877株(b1oD₁)を形質転換し、アンビシリン50mgを含む選択培地[K₂HPO₄ 7g, KH₂PO₄ 2g, (NH₄)₂SO₄ 1g, MgSO₄·7H₂O 0.1g、カゼミノ酸10g、グルコース2g及び寒天16gを蒸留水1Lに溶解]に塗沫した。

【0083】この培地上への、変異株の生育を見ることにより、デレーションミュータントDNA断片による、

28

変異株の相補性を調べた。その結果を図2に示す4.0kbのDNA断片のうち、右側末端の約2.4kbのDNA断片上に左からb1oA、b1oDの順に各々遺伝情報がコードされていることが明らかになった。

【0084】(C) ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼをコードする遺伝子(b1oA)の塩基配列の決定

実施例2の(D)項で得られた、ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスクオピオチンシンセターゼをコードする遺伝子(b1oA及びb1oD)を含む長さ約4.0kbの図2に示すDNA断片のうち、右側末端の約2.4kbのDNA断片について、実施例3の(A)項で得られた40クローンのデレーションミュータントからさらに選抜した17クローン（図2中に→で示す）を使って、その塩基配列をM13ファージを用いる、ダイオキシヌクレオチド酵素法(dideoxy chain termination法) (Sanger, F. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463, 1977)により決定した。

【0085】その塩基配列中には、図1の切断点地図に示したSacI上流からDraII、BamHIの方向に向って一つの大きなオープンリーディングフレームと、BamHI下流からSalIの方向に向ってもう一つのオープンリーディングフレームが存在していた。

【0086】この二つのオープンリーディングフレームのうち、SacI部位の133~131塩基上流の翻訳開始コドンから始まるオープンリーディングフレームの存在から、ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼをコードする遺伝子(b1oA)は、前記配列番号

30 1で示した塩基配列を有する423のアミノ酸をコードする1269の塩基対より構成されていることが明らかとなった。

【0087】また、BamHI部位の113~115塩基下流の翻訳開始コドンATGに統いて224のコドンがつながっているオープンリーディングフレームの存在から、デスクオピオチンシンセターゼをコードする遺伝子(b1oD)は、前記配列番号2で示した塩基配列を有する224のアミノ酸をコードする672の塩基対により構成されていることが明らかとなった。

【0088】(A) プラスミドpBY503の調製

プラスミドpBY503は、プレビバクテリウム・スタチオニスIF012144 (FERM BP-2515)から分離された分子量約10メガダルトンのプラスミドであり、特開平1-95785号公報に記載のようにして調製した。半合成培地A培地 [尿素2g, (NH₄)₂SO₄ 7g, K₂HPO₄ 0.5g, KH₂PO₄ 0.5g, MgSO₄ 0.5g, FeSO₄ 7H₂O

6 mg、 $MnSO_4 \cdot 4 \sim 6 H_2O$ 6 mg、酵母エキス 2.5 g、カザミノ酸 5 g、ビオチン 200 μg 、塩酸チアミン 200 μg 、グルコース 20 g 及び純水 1 リットル] 1 リットルに、ブレビパクテリウム・スタチオニス 1 F 0 1 2 1 4 4 を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を 10 mg/ml の濃度でリゾチームを含む緩衝液 [25 mM トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、10 mM の EDTA、50 mM グルコース] 20 ml に懸濁し、37 °C で 1 時間反応させた。反応液にアルカリ-SDS 液 [0.2 N NaOH、1% (W/V) SDS] 40 ml を添加し、緩やかに混和して室温にて 15 分間静置した。次に、この反応液に酢酸カリウム溶液 [5 mM 酢酸カリウム溶液 60 ml、酢酸 11.5 ml、純水 28.5 ml の混合液] 30 ml を添加し、充分混和してから氷水中に 15 分間静置した。

【0089】溶菌物全量を遠心管に移し、4 °C で 10 分間、15,000 × g の遠心分離にかけ、上澄液を得た。

【0090】これに等量のエノールークロロホルム液 (エノール:クロロホルム = 1:1 混合液) を加え懸濁した後、遠心管に移し、室温下で 5 分間、15,000 × g の遠心分離にかけ、水層を回収した。水層に 2 倍量のエタノールを加え、-20 °C で 1 時間静置後、4 °C で 10 分間、15,000 × g の遠心分離にかけ、沈殿を回収した。

【0091】沈殿を減圧乾燥後、TE 緩衝液 [トリス 10 mM、EDTA 1 mM、HCl にて pH 8.0 に調整] 2 ml に溶解した。溶解液に塩化セシウム溶液 [5 倍濃度の TE 緩衝液 100 ml に塩化セシウム 170 g を溶解させた液] 1.5 ml と 10 mg/ml エチジウムプロマイド溶液 1 ml を加えて、密度を 1.392 g/ml に合わせた。この溶液を 12 °C で 42 時間、116,000 × g の遠心分離を行つた。

【0092】プラスミド pBY503 は紫外線照射により遠心管内で下方のバンドとして見い出される。このバンドを注射器で遠心管の側面から抜きとることにより、プラスミド pBY503 を含む分画液を得た。

【0093】次いでこの分画液を等量のイソアミルアルコールで 4 回処理してエチジウムプロマイドを抽出除去し、その後に TE 緩衝液に対して透析を行つた。このようにして得られたプラスミド pBY503 を含む透析液に 3 M 酢酸ナトリウム溶液を最終濃度 30 mM に添加した後、2 倍量エタノールを加え、-20 °C 1 時間静置した。この溶液を 15,000 × g の遠心分離にかけて DNA を沈降させ、プラスミド pBY503 を 50 μg 得た。

【0094】(B) プラスミドベクター pCRY30 の作成

プラスミド pHSG298 (宝酒造製) 0.5 μg に制限酵素 Sall (5 unit) を 37 °C 1 時間反応させ、プラ

スミド DNA を完全に分解した。

【0095】前記 (A) 項で調製したプラスミド pBY503 の 2 μg に制限酵素 Xba I (1 unit) を 37 °C で 30 分間反応させ、プラスミド DNA を部分分解した。

【0096】両者のプラスミド DNA 分解物を混合し、制限酵素を不活性化するために 65 °C で 10 分間加熱処理した後、該失活溶液中の成分が最終濃度として各々 50 mM トリス緩衝液 pH 7.6、10 mM MgCl₂、10 mM ジチオスレイトール、1 mM ATP 及び T4 DNA リガーゼ 1 unit になるよう各成分を強化し、16 °C で 15 時間保温した。この溶液を用いてエシエリヒア・コリ JM 109 コンピテントセル (宝酒造製) を形質転換した。

【0097】形質転換株は 30 $\mu g/ml$ (最終濃度) のカナマイシン、100 $\mu g/ml$ (最終濃度) の IPTG (イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド)、100 $\mu g/ml$ (最終濃度) の X-gal (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド) を含む L 培地 (トリプトン 10 g、酵母エキス 5 g、NaCl 5 g 及び純水 1 リットル、pH 7.2) で 37 °C にて 24 時間培養し、生育株として得られた。これらの生育株のうち、白いコロニーで生育してきたものを選択し、各々プラスミドをアルカリ-SDS 法 [T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, "Molecular cloning" (1982) p90-91 参照] により抽出した。

【0098】その結果、プラスミド pHSG298 の Sal I 部位にプラスミド pBY503 由来の約 4.0 kb の断片が挿入されたプラスミド pHSG298-or 1 が得られた。

【0099】次の同様の方法を用い、前記 (A) 項で得られたプラスミド pBY503 DNA を制限酵素 Kpn I 及び Eco RI にて処理して得られる約 2.1 kb の DNA 断片を上記プラスミド pHSG298-or 1 の Kpn I 及び Eco RI 部位にクローニングし、プラスミドベクター pCRY30 を調製した。

【0100】

【実施例 5】プラスミド pCRY30-or 3 の作成及びコリネ型細菌への導入

実施例 2 で得られたプラスミド pBS-or AD4 の 5 μg を制限酵素 Sal I を 5 unit 用いて 37 °C で 1 時間反応させ分解したものと、実施例 3 で得られたプラスミド pCRY30 の 1 μg を制限酵素 Xba I の 1 unit を用いて 37 °C で 1 時間反応させ分解したものを混合し、50 mM トリス緩衝液 (pH 7.6)、10 mM ジチオスレイトール、1 mM ATP、10 mM MgCl₂ および T4 DNA リガーゼ 1 unit の各成分を添加し (各成分の濃度は最終濃度である)、12 °C で 15 時間反応させ結合させた。このプラスミドを用いて前記方法に従いエシエリヒア・コリ R 873 (or A4) 株を形質転換し、カナマイシン 50 $\mu g/ml$ を含む選択培地 [K₂HPO₄

31

7 g、 KH_2PO_4 2 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g、 $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g、カザミノ酸 10 g、グルコース 2 g 及び寒天 16 g を蒸留水 1 リットルに溶解] に塗沫した。

【0101】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミド pCRY30 の長さ 8.6 kb のDNA断片に加え、長さ 4.0 kb の挿入DNA断片が認められた。

【0102】上記の如く調製されたプラスミドDNAをコリネ型細菌へ形質転換した。

【0103】形質転換は、電気パルス法を用いて行つた。プレビバクテリウム・フラバム MJ-233 (FERM BP-1497) プラスミド pBY502 除去株を 100 ml の前記 A 培地で対数増殖初期まで培養し、ベニシリングを 1 ユニット/ml になるように添加して、さらに 2 時間振とう培養し、遠心分離により菌体を集め、*

表4 プラスミド pCRY30-b1o3

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
BamHI	2	1.1, 3.9
EcoRI	1	12.6
KpnI	1	12.6
SacI	2	2.5, 10.1
SalI	2	0.4, 12.2
XbaI	1	12.6

上記制限酵素により特徴づけられるプラスミドを pCRY30-b1o3 と命名した。このプラスミドの制限酵素切断点地図を図2に示す。

【0105】なお、プラスミド pCRY30-b1o3 により形質転換されたプレビバクテリウム・フラバム MJ-233-B1O3 は、茨城県つくば市東1丁目1番3号の工業技術院微生物工業技術研究所に、平成3年2月26日付で：微工研菌寄第12041号 (FERM P-12041) として寄託されている。

【0106】

【実施例6】プラスミド pCRY30-b1o3 の安定性

前記のA培地 100 ml を 500 ml 容三角フラスコに分注し、120℃で15分間滅菌処理したものに、実施例4で得た形質転換プレビバクテリウム・フラバム MJ-233-B1O3 を植菌し、30℃にて24時間振とう培養を行つた後、同様にして調製したA培地 100 ml を 500 ml 容三角フラスコに分注し、120℃で15分間滅菌したものに、1 ml当たり 50 cells の割合になるように植継し、同じく30℃にて24時間振とう培養を行つた。次に遠心分離して集菌し、菌体を洗浄後、カナマイシンを 50 μg/ml の割合で添加したA培地及び無添加のA培地を用いて調製した平板培地に一定量塗沫し、30℃にて1日培養後生育コロニーをカウントした。

32

*菌体を 20 ml のパルス用溶液 (272mM Sucrose 、 $7\text{mM KH}_2\text{PO}_4$ 、 1mM MgCl_2 : pH 7.4) にて洗浄した。さらに菌体を遠心分離して集め、5 ml のパルス用溶液に懸濁し、0.75 ml の細胞と、前記で得られたプラスミドDNA溶液 50 μl を混合し、水中にて 20 分間静置した。ジーンバルサー (バイオラド社製) を用いて、2500 ボルト、 $25\mu\text{FD}$ に設定し、パルスを印加後氷中に 20 分間静置した。全量を 3 ml の前記 A 培地に移し 30℃にて 1 時間培養後、カナマイシン 15 μg/ml (最終濃度) を含む前記 A 寒天培地に植菌し 30℃で 2 ~ 3 日間培養した。出現したカナマイシン耐性株より、前記実施例2 (A) 項に記載の方法を用いてプラスミドを得た。このプラスミドを各種制限酵素で切断し、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表4に示す。

【0104】

【表5】

【0107】この結果、カナマイシン添加および無添加培地に生育したコロニーは同数であること、さらに A 培地生育コロニーは全てカナマイシン添加培地に生育すること、すなわち該プラスミドの高度の安定性を確認した。

【0108】

【実施例7】ジアミノペラルゴン酸アミノトランスクエラーゼ及びデスチオビオチンシンセターゼの製造

培地 (尿素 0.2%、硫酸アンモニウム 0.7%、 KH_2PO_4 0.05%、 K_2HPO_4 0.05%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6 ppm、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 6 ppm、チアミン・HCl 100 μg/l、及びビオチン 200 μg/l) 100 ml を 500 ml 容三角フラスコに分注、滅菌 (滅菌後 pH 7.0) した後、プレビバクテリウム・フラバム MJ-233-B1O3 株を植菌し、無菌的にグルコースを最終濃度 2% (W/V) なるように加え、30℃にて 3 日間振とう培養を行つた。

【0109】対照としてプラスミド pCRY30-b1o3 を保持しないプレビバクテリウム・フラバム MJ-233 株を植菌し、同様に培養を行つた。

【0110】この培養液をベツクマン遠心機 Model J2-21 を用いて、8000 rpm で 10 分間、遠心し、菌体を集菌する。本試験菌体約 5 mg に、0.5 M Tris -

33

HCl (pH 6.8) を 0.125ml、10% (W/V) SDS を 0.200ml、β-メルカプトエタノールを 0.050ml を添加し、水で全量を 1.0ml に合わせる。この試料液を沸騰水中で約 3 分間処理する。上記の試料液 1ml に対して、0.05% (W/V) BPPB と 70% (V/V) グリセロールを含む 1 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) の 0.1ml を加えたものを泳動用試料液とする。

【0111】試料液を「第一化学薬品(株)」製 SDS-PAGE プレート 10/20-1010 を用い、試料を 5 μl アプライした後、60mA の定電流で、約 60 分間泳動する。

【0112】Coomassie Brilliant Blue R-250 の 0.25% (W/V) (正味の濃度) を含むエタノール-酢酸-水 (9:2:9, V/V) 混液にゲルプレートを浸して分離ゲル中の試料蛋白質の染色を行う。室温で約 6 時間染色した後、エタノール・酢酸・水 (25:8:65, V/V) 混液 (脱色液) に浸し、軽く振とうし、直ちに、新しい脱色液と交換する。以後は、約 1 時間ごとに新しい脱色液と交換する。この脱色操作を分離ゲル中の蛋白質のバンドがかなり明瞭に見えるようになるまで繰り返す (3~5 時間)。つぎに、分離ゲルをメタノール・酢酸・水 (10:15:175, V/V) 混液 (保存液) に浸して、蛋白質の存在していない部分 (パツクグランド) を完全に脱色する。かくして、ゲル上に分子量 4 万と、約 2 万の 2 つのタンパク質のバンドとして染色されていることにより、各々、ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼおよび、デスチオビオチンシンセターゼが菌体内で產生されてることを確認することができる。このバンドの濃度を、ファルマシア社製「Ultra Scan XL レーザーデンシトメーター」を用いて、測定した結果、ブレビバクテリウム・フラバム MJ 233-B103 株中に含まれるジアミノペラルゴン

配列：

ATG GAA AAC CCC AGC TTG CGC GAG CTT GAT CAC CGA AAC ATC TGG CAC	48
Met Glu Asn Pro Ser Leu Arg Glu Leu Asp His Arg Asn Ile Trp His	
1 5 10 15	
CCG TAT GCC CGC CCG GGC GTG CGC AAC AGA CTC GTC ACC AAC ACT GAT	96
Pro Tyr Ala Ala Pro Gly Val Arg Asn Arg Leu Val Thr Asn Thr Asp	
20 25 30	
GGG GTG TTC TTG ACG CTG GAA GAT GGC AGC ACC GTG ATT GAC GCG ATG	144
Gly Val Phe Leu Thr Leu Glu Asp Gly Ser Thr Val Ile Asp Ala Met	
35 40 45	
AGC TCC TGG TCG TCG GCA ATT CAT GGA CAC GGA CAC CCC CGA CTG AAA	192
Ser Ser Trp Trp Ser Ala Ile His Gly His Gly His Pro Arg Leu Lys	
50 55 60	
CGT GCC GCC CAA AAA CAA ATC GAC ACC ATG AGT CAC GTC ATG TTC GGC	240
Arg Ala Ala Gln Lys Gln Ile Asp Thr Met Ser His Val Met Phe Gly	
65 70 75 80	
GGA CTA ACC CAC GAG CCC GGC ATT AAG CTC ACC CAC AAA CTC CTC AAT	288

34

酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオビオチンシンセターゼの含量は、pCRY30-b1o3 を保持しないブレビバクテリウム・フラバム MJ-233 株に比べて、約 5 倍に上昇していることが明らかとなつた。

【0113】

【発明の効果】本発明の新規な DNA 断片は、コリネ型細菌のビオチン生合成に関与する酵素のうち、ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオビオチンシンセターゼをコードする遺伝子 (b1oA b1oD) を含む DNA 断片であり、該 DNA 断片を含む本発明のプラスミドを用いることにより、コリネ型細菌に属する微生物の遺伝子操作による改良が可能となる。

【0114】また、このようにして改良された本発明のコリネ型細菌に属する微生物を培養することにより、微生物菌体内でジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオビオチンシンセターゼの産生が増加し、該酵素の菌体内への高度蓄積が可能となる。

【0115】

【配列】配列番号：1
20 配列の長さ：1272
配列の型：核酸
鎖の数：二本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：Genomic DNA
起源
生物名：ブレビバクテリウム フラバム (*Brevibacterium flavum*)
株名：MJ233
配列の特徴
30 特徴を表す記号：Peptide
存在位置：1-1269
特徴を決定した方法：S

35

36

Gly Leu Thr His Glu Pro Ala Ile Lys Leu Thr His Lys Leu Asn
 85 90 95
 CTC ACT GGC AAT GCC TTT GAC CAC GTC TTT TAT TCC GAT TCG GGC TCG 336
 Leu Thr Gly Asn Ala Phe Asp His Val Phe Tyr Ser Asp Ser Gly Ser
 100 105 110
 GTC TCG GTG GAG GTC GCC ATC AAA ATG GCA CTG CAG GCC TCC AAA GGA 384
 Val Ser Val Glu Val Ala Ile Lys Met Ala Leu Glu Ala Ser Lys Gly
 115 120 125
 CAA GCC CAC CCG GAA CGC ACA AAA CTC CTC ACC TGG CGG TCC GGC TAC 432
 Gln Gly His Pro Glu Arg Thr Lys Leu Leu Thr Trp Arg Ser Gly Tyr
 130 135 140
 CAC GGA GAC ACA TTC ACC GCG ATG AGC GTG TGC GAC CCA GAA AAT GGC 480
 His Gly Asp Thr Phe Thr Ala Met Ser Val Cys Asp Pro Glu Asn Gly
 145 150 155 160
 ATG CAT ACC CTC TCG AAA GGC ACA CTC CCC GAG CAG ATT TTC GCC CCC 528
 Met His Ser Leu Trp Lys Gly Thr Leu Pro Glu Gln Ile Phe Ala Pro
 165 170 175
 GCC CCA CCA GTT CGG GGG TCA TCG CCC CAG GCA ATT TCC GAG TAC CTG 576
 Ala Pro Pro Val Arg Gly Ser Ser Pro Glu Ala Ile Ser Glu Tyr Leu
 180 185 190
 CAC ACC ATG GAA TTG CTT ATC GAC GAG ACC GTC TCC GCA ATC ATC ATC 624
 His Ser Met Glu Leu Leu Ile Asp Glu Thr Val Ser Ala Ile Ile Ile
 195 200 205
 GAA CCG ATC GTC CAA GGC GCT GGA GGC ATG CGG TTT CAC GAT GTC GCA 672
 Glu Pro Ile Val Gln Gly Ala Gly Gly Met Arg Phe His Asp Val Ala
 210 215 220
 CTC ATT GAA GGA GTC GCG GCA CTG TGC AAG AAG CAC GAT CGT TIC TTG 720
 Leu Ile Glu Gly Val Ala Ala Leu Cys Lys Lys His Asp Arg Phe Leu
 225 230 235 240
 ATC GTC GAT GAA ATT GCC ACC GGT TTC GGC CGC ACC GGT GAA CTA TTT 768
 Ile Val Asp Glu Ile Ala Thr Gly Arg Thr Gly Glu Leu Phe
 245 250 255
 GCC ACG TTA AGC AAT GGC GTA CAA CCA GAC ATC ATG TGT GTG GGC AAG 816
 Ala Thr Leu Ser Asn Gly Val Gln Pro Asp Ile Met Cys Val Gly Lys
 260 265 270
 GCC CTC ACC GGT GGA TTC ATG TCT TTT GCC GCC ACT GTA TGC ACG GAC 864
 Ala Leu Thr Gly Gly Phe Met Ser Phe Ala Ala Thr Val Cys Thr Asp
 275 280 285
 AAG GTG GCT CAA TTG ATC AGA TCC CCA GAA GGC GGA GGT GTG CTG ATG 912
 Lys Val Ala Gln Leu Ile Arg Ser Pro Glu Gly Gly Val Leu Met
 290 295 300
 CAT GGC CCC ACC TTT ATG GCT AAT CCT CTG GCC TGT GAG GTT TCG CAC 960
 His Gly Pro Thr Phe Met Ala Asn Pro Leu Ala Cys Glu Val Ser His
 305 310 315 320
 GCT TCG CTA GAA ATC ATT GAG ACC GGC ATG TGG CAG AAA CAG GTT AAA 1008
 Ala Ser Leu Glu Ile Ile Glu Thr Gly Met Trp Glu Lys Glu Val Lys
 325 330 335
 AAA ATC GAA GGC AAA CTT ATC GCA GGC CTT TCC CCA CTT CGA TGT ATT 1056
 Lys Ile Gln Ala Lys Leu Ile Ala Gly Leu Ser Pro Leu Arg Cys Ile
 340 345 350

37

38

CCA CGA GTT GCC GAT GTC CGG GTT CTC CGC GCG ATT GGC GTC ATC GAA 1104
 Pro Gly Val Ala Asp Val Arg Val Leu Gly Ala Ile Gly Val Ile Glu
 355 360 365
 ATG GAA CAA AAT GTG AAT GTC GAA GAA GCC ACT CAG GCT GCA TTA GAT 1152
 Met Glu Gln Asn Val Asn Val Glu Glu Ala Thr Gln Ala Ala Leu Asp
 370 375 380
 CAC CGT GTG TGG ATC CGC CCC TTT GGA CGC TTG CTC TAT GTC ATG CCC 1200
 His Gly Val Trp Ile Arg Pro Phe Gly Arg Leu Leu Tyr Val Met Pro
 385 390 395 400
 CCA TAT ATC ACC ACG TCA GAG CAA TCC GCA CAG ATC TCC CGC GCG CTT 1248
 Pro Tyr Ile Thr Thr Ser Glu Gln Cys Ala Gln Ile Cys Arg Ala Leu
 405 410 415
 CAT GCT GCA GTT AAA GGA AAA TAA 1272
 His Ala Ala Val Lys Gly Lys
 420

配列番号：2

配列の長さ：675

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：ブレビバクテリウム フラバム (*Brevibacterium flavum*)

株名：MJ233

20 配列の特徴

特徴を表す記号：Peptide

存在位置：1-672

配列を決定した方法：S

配列：

ATG CCA TTT TTA TTT GTC AGC GGC ACC GGA ACC GGG GTT GGA AAG ACC 48
 Met Pro Phe Leu Phe Val Ser Gly Thr Gly Thr Gly Val Gly Lys Thr
 1 5 10 15
 TTC TCC ACA GCC GTT TTG GTT CGT TAC TTA GCC GAT CAA GGA CAC GAT 96
 Phe Ser Thr Ala Val Val Arg Tyr Leu Ala Asp Gln Gly His Asp
 20 25 30
 GTT CTG CCC GTA AAG CTC GTC CAA ACA GGT GAA CTT CCA GCC GAA GGA 144
 Val Leu Pro Val Lys Leu Val Gln Thr Gly Glu Leu Pro Gly Glu Gly
 35 40 45
 GAC ATC TTC ACC ATT GAA CGC TTG ACT GGA ATT GCT GGA GAG GAA TTT 192
 Asp Ile Phe Thr Ile Glu Arg Leu Thr Gly Ile Ala Gly Glu Glu Phe
 50 55 60
 CCT CGT TTC AAA GAC CCT CTT GCG CCA AAT CTG GCA GGC CGA CGA GAG 240
 Ala Arg Phe Lys Asp Pro Leu Ala Pro Asn Leu Ala Ala Arg Arg Glu
 65 70 75 80
 GGG ATC GAG CCA ATA CAG TTT GAT CAG ATT ATC TCG TGG CTT CGT GGT 288
 Gly Ile Glu Pro Ile Gln Phe Asp Gln Ile Ile Ser Trp Leu Arg Gly
 85 90 95
 TTT GAC GAC CCA GAT CGC ATC ATT GTG GTG GAG GGC GCT GGT GGC CTG 336
 Phe Asp Asp Pro Asp Arg Ile Ile Val Val Gln Gly Ala Gly Gly Leu
 100 105 110
 CTG GTC AGA TTA GGG GAA GAT TTC ACC CTG GCA GAT GTT GCC TCC GCT 384
 Leu Val Arg Leu Gly Glu Asp Phe Thr Leu Ala Asp Val Ala Ser Ala
 115 120 125
 TTG AAT GCA CCC TTA GTG ATT TGG ACA ACC ACC GGA TTG GGA ACC CTC 432
 Leu Asn Ala Pro Leu Val Ile Trp Thr Ser Thr Gly Leu Gly Ser Leu

39	130	135	140	40
	AAC GCT GCT GAA TTA AGC GTT GAG GCA GCA AAC CGC CGA GGA CTC ACA			480
	Asn Ala Ala Glu Leu Ser Val Glu Ala Ala Asn Arg Arg Gly Leu Thr			
145	150	155	160	
	GTG TTG GGA GTC CTC GCC GGT TCG ATC CCT CAA AAT CCT GAT CTA GCT			528
	Val Leu Gly Val Leu Gly Gly Ser Ile Pro Glu Asn Pro Asp Leu Ala			
165	170	175		
	ACG ATG CTT AAT CTC GAA GAA TTT GAG AGA GTC ACC GGC GTG CCC TTI			576
	Thr Met Leu Asn Leu Glu Glu Phe Glu Arg Val Thr Gly Val Pro Phe			
180	185	190		
	TGG GGA GCT TTG CCG GAA GGG TTG TCA CGG GTG GAG GGG TTC GTC GAA			624
	Trp Gly Ala Leu Pro Glu Gly Leu Ser Arg Val Glu Gly Phe Val Glu			
195	200	205		
	AAG CAA TCT TTT CCG GCC CTT GAT GCC TTT AAG AAA CCG CCG GCA AGG			672
	Lys Gln Ser Phe Pro Ala Leu Asp Ala Phe Lys Lys Pro Pro Ala Arg			
210	215	220		
	TCA			675

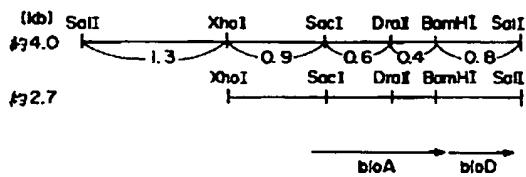
【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオビオチンシンセターゼをコードする遺伝子(bioA, bioD)を含むDNA断片の制限酵素切断点地図。

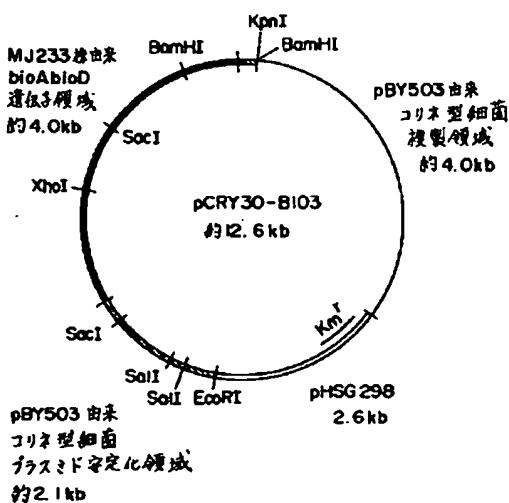
【図2】本発明のbioA及びbioD塩基配列決定の戦略図。

【図3】本発明のプラスミドpCRY30-bio3の制限酵素切断点地図。

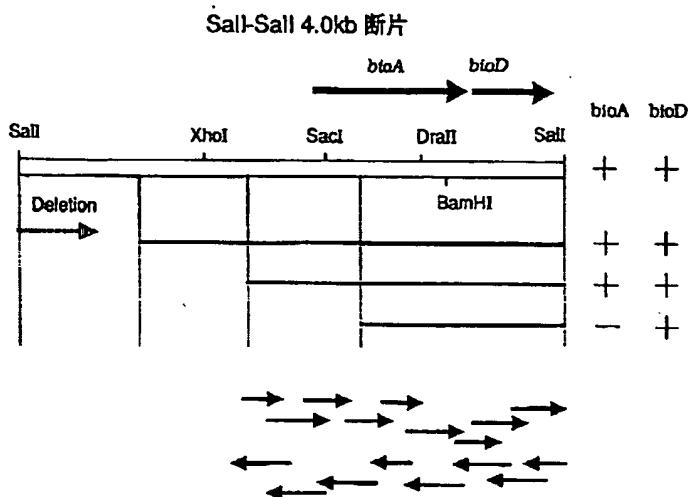
【図1】



【図3】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁵
C 12 N 15/52
//(C 12 N 15/54
C 12 R 1:13)
(C 12 N 1/21
C 12 R 1:13)

識別記号 廣内整理番号 F I

技術表示箇所

(72) 発明者 畠山 和久
茨城県稻敷郡阿見町中央8丁目3番1号三
菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72) 発明者 久留主 泰朗
茨城県稻敷郡阿見町中央8丁目3番1号三
菱油化株式会社筑波総合研究所内
(72) 発明者 湯川 英明
茨城県稻敷郡阿見町中央8丁目3番1号三
菱油化株式会社筑波総合研究所内